

# Měření spektrálních charakteristik a stanovení koncentrace DNA a proteinů

Spektroskopie v UV oblasti umožňuje stanovit koncentraci a čistotu biologických molekul. Molekuly DNA mají absorpční maximum v okolí 260 nm, molekuly proteinů v okolí 280 nm. Pro přímé spektrální určení koncentrace se využívá Lambert-Beerova zákona pro monochromatické světlo, který lze zapsat ve tvaru  $A = c \cdot \epsilon$  za předpokladu, měříme v 1 cm kyvetě a známe extinkční koeficient  $\epsilon$ , který má jednotku  $[M^{-1}cm^{-1}]$  pro molární koncentraci nebo  $[mL \cdot mg^{-1} \cdot cm^{-1}]$  pro koncentraci v mg/mL.

V případě, že neznáme extinkční koeficient můžeme pro určení koncentrace DNA o vysoké molekulární hmotnosti použít zjednodušeného předpokladu, že roztok dvouřetězcové DNA o absorbanci 1 má koncentraci 50  $\mu g/mL$  a pro převod na molární koncentraci nukleotidu DNA pak vztah  $320 \mu g/mL = 1 mM$ .

Pro určení koncentrace proteinů v případě, že známe jejich sekvenci lze použít známé extinkční koeficienty pro absorbanci při 280 nm nebo univerzální Bradfordové metodu, která využívá posunu absorpčního maxima „Coomasie Blue“ po vazbě na protein.

## Materiál

- DNA (Salmon sperm)
- Oligonukleotid CNF2\_Top (5' CAATAGGAAACTCCCAAATC)
- Sérový albumin ( $\epsilon = 0.677 mL \cdot mg^{-1} \cdot cm^{-1}$ , MW = 66430)
- TE pufr
- Kyvety
- Bradford reagent (BioRad)
- Spektrofotometr Beckman

## Postup

### DNA

Připravte roztok DNA v TE pufru ze zásobního roztoku o přibližné koncentraci 20 mg/mL tak, aby bylo možno přesně určit koncentraci DNA.

Změřte absorpční spektrum DNA v rozsahu vlnových délek 220 až 350 nm.

Určete polohu absorpčního maxima.

Stanovte přesnou koncentraci DNA v zásobním roztoku z hodnoty absorbance naředěného roztoku při 260 nm. Koncentraci vyjádřete v mg/mL a v OD/mL.

Nařed'te roztok oligonukleotidu v TE pufru tak, aby bylo spektroskopicky možno přesně stanovit jeho koncentraci.

Na základě zadané sekvence oligonukleotidu stanovte extinkční koeficient  $\epsilon_{260}$  a spektroskopicky určete jeho koncentraci.

<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx?c=EU>

Porovnejte spektrum oligonukleotidu se spektrem fluorescenčně značeného oligonukleotidu v rozsahu vlnových délek 220 až 600 nm.

## **Protein**

### **UV spektroskopie**

Připravte roztok BSA v TE pufru ze zásobního roztoku o přibližné koncentraci 10 mg/mL tak, aby bylo možno přesně určit koncentraci BSA.

Změřte absorpční spektrum BSA v rozsahu vlnových délek 240 až 350 nm.

Určete polohu absorpčního maxima.

Stanovte přesnou molární koncentraci BSA v zásobním roztoku z hodnoty absorbance naředěného roztoku při 280 nm.

### **Bradfordové metoda**

Připravte standardní kalibrační křivku pro měření koncentrace proteinu Bradfordové metodou.

Změřte koncentraci BSA pomocí této metody.

Vezměte roztok reakčního Bradfordové činidla z lednice a nechte jej zahřát na pokojovou teplotou a promíchejte.

Připravte roztoky blanku a standardů BSA o celkovém objemu 1 mL do mikrokumavek tak, že do 980  $\mu$ L reakčního Bradfordové činidla přidejte vždy 20  $\mu$ L TE pufru, a 20  $\mu$ L 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.75 mg/mL, 1 mg/mL a 1.25 mg/mL. Současně připravte stejným způsobem roztok neznámého vzorku.

Všechny roztoky dobře promíchejte a nechte inkubovat 5 min při pokojové teplotě. Inkubace by neměla přesáhnout 1 h.

Nastavte spektrofotometr na 595 nm. Vynulujte roztokem blanku.

Změřte absorbanci roztoku standardů. Při měření postupujte od nejnižší koncentrace standardu k nejvyšší.

Vytvořte kalibrační křivku.

Změřte absorbanci neznámého vzorku a pomocí kalibrační křivky určete jeho koncentraci.

Porovnejte hodnoty koncentrace zásobního roztoku BSA určené spektroskopicky při 280 nm a pomocí Bradfordové metody.